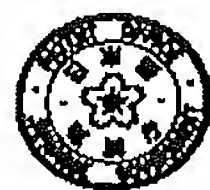


(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **2001335512 A**

(43) Date of publication of application: **04.12.01**

(51) Int. Cl

**A61K 47/44**  
**A61K 31/711**  
**A61K 47/02**  
**A61K 47/10**  
**A61K 47/18**  
**A61K 47/24**  
**A61K 47/28**  
**A61K 48/00**  
**// C12N 15/09**

(21) Application number: **2000151973**

(22) Date of filing: **23.05.00**

(71) Applicant: **YAMANOUCHI PHARMACEUT CO LTD**

(72) Inventor: **NAGAI TSUNEJI**  
**YONETANI YOSHIE**  
**O SHUNPEI**  
**TANAKA SHUNICHI**

(54) **MICROPARTICLE FOR TRANSDUCING GENE**

preparable by simple operations.

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a carrier for an agent, a physiologically active substance, a gene or the like at low cost, having a high introduction or transduction efficiency of a useful substance and

SOLUTION: This microparticle for a pharmaceutical preparation is characterized as comprising a phospholipid, a cationic lipid and a polyethylene glycol binding lipid.

COPYRIGHT: (C)2001,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-335512

(P2001-335512A)

(43) 公開日 平成13年12月4日 (2001.12.4)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	データベース <sup>*</sup> (参考)
A 6 1 K 47/44		A 6 1 K 47/44	4 B 0 2 4
31/711		31/711	4 C 0 7 6
47/02		47/02	4 C 0 8 4
47/10		47/10	4 C 0 8 6
47/18		47/18	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-151973(P2000-151973)

(22) 出願日 平成12年5月23日 (2000.5.23)

(71) 出願人 000006677

山之内製薬株式会社

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

(72) 発明者 永井 恒司

東京都文京区駒込1-23-10-103

(72) 発明者 米谷 芳枝

東京都世田谷区中町3-24-8-409

(72) 発明者 王 俊平

東京都品川区小山台1-5-7

(72) 発明者 田中 俊一

神奈川県横浜市金沢区谷津町341

(74) 代理人 100088616

弁理士 渡邊 一平 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子導入のための微粒子

(57) 【要約】

【課題】 有用物質の導入効率が高く、簡便な操作で調製でき、かつ、低コストの薬剤、生理活性物質、遺伝子等の運搬体を提供する。

【解決手段】 リン脂質、カチオン性脂質、及びポリエチレングリコール結合脂質を含有することを特徴とする製剤用微粒子。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 リン脂質、カチオン性脂質、及びポリエチレングリコール結合脂質を含有することを特徴とする製剤用微粒子。

【請求項2】 リン脂質が、大豆レシチンである請求項1に記載の製剤用微粒子。

【請求項3】 カチオン性脂質が、 $3\beta$  [N-(N7, N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル] コlesteroール及び／又はステアリルアミンである請求項1又は2に記載の製剤用微粒子。

【請求項4】 ポリエチレングリコール結合脂質が、ポリエチレングリコール結合ジステアロイルホスファチジルエタノールアミンである請求項1～3のいずれか一項に記載の製剤用微粒子。

【請求項5】 塩化カルシウム及び／又はグリセリンを含有する請求項1～4のいずれか一項に記載の製剤用微粒子。

【請求項6】 請求項1～5のいずれか一項に記載の製剤用微粒子と遺伝子との複合体であることを特徴とする遺伝子導入剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、薬剤、生理活性物質、遺伝子等の有用物質を標的組織の細胞内に高い効率で導入し得る製剤用微粒子に関し、詳しくは当該製剤用微粒子と遺伝子とを複合せしめた遺伝子導入剤に関する。

【0002】

【従来の技術】疾病の治療に際しては、薬剤、生理活性物質（ホルモン、リンホカイン等）等の有用物質を標的組織の細胞内に導入するための運搬体（キャリア）が必要となる。特に近年、遺伝子治療やアンチセンス医薬等の技術の進歩に伴って、特定の遺伝子を標的組織の細胞内に効率良く導入するための運搬体の開発が盛んに行われている。

【0003】従来、特定の遺伝子を標的組織の細胞内に導入するための運搬体としては、ウイルスベクターが利用されてきたが（Hodgson, Bio/Technology 3, 222(1995)、Jolly, Cancer Gene Therapy 1, 51(1994)等）、例えば細胞内においてウイルスベクターと野生型ウイルスとの予期しない相同的組み替えにより増殖能力を有する野生型ウイルスが出現する危険性がある等、の問題点があった。そこで、非ウイルス性の運搬体として、リポソームを利用する方法が提案されている。

【0004】リポソームは、脂質を水中に分散させた際に形成される、脂質二重膜により閉鎖された内水相を有する小胞体であり、生体細胞の形質膜と同様の基本構造を有するため、生体膜との親和性が高いことに加え、脂質二重膜の内部や内水相に薬剤等を封入可能であること、生体代謝が容易であり毒性や免疫原性が少ないこと

等、ウイルスベクターにはない種々の利点を有しており、運搬体としての利用が期待できる。

【0005】実際に、生理活性物質をコードする遺伝子を、リポソームの内水相に封入保持した状態で、或いはリポソームとの複合体として、患者に投与することにより標的組織の細胞内に遺伝子を導入し、生理活性物質を生産させる遺伝子治療等も研究されている。このような遺伝子の運搬体としては、例えば負電荷を有するDNAとの複合体形成が容易なカチオン性脂質から調製したカチオン性リポソームが利用されている（特開平9-278726号公報、特開平11-187873号公報等）。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、従来のカチオン性リポソームは、標的組織の細胞内への遺伝子の導入効率が低いという問題点があった。カチオン性リポソームは構成する脂質自体の正電荷は多いものの、脂質二重膜構造をとるため、リポソームの外側のみならず、内水相側にも正電荷が配向している。即ち、脂質の正電荷がDNAとの複合体形成に有効に利用されていないため、DNAとの複合体形成率が低く、標的組織の細胞内への遺伝子の導入効率も低いという問題があった。

【0007】また、カチオン性リポソームは、即時に使用することができず、その調製及び製剤に長時間を要する（例えば9工程、2日間）という問題点があった。カチオン性リポソームを構成するカチオン性脂質はエステル結合を有している場合が多く、酸、或いは塩基触媒による加水分解を受け易い。従って、カチオン性リポソームは懸濁液の状態では不安定であり、凍結した状態で保存することが多いため、使用に際しては凍結融解等の前処理が必須である。即ち、簡便な操作で調製できるものとは言い難く、その調製及び製剤に長時間を要するという問題があった。

【0008】更に、カチオン性リポソームは、特殊な構造の合成脂質を利用していることに起因してコスト的にも極めて高価であるという問題を抱えていた。

【0009】従って、従来のカチオン性リポソームは、薬剤、生理活性物質、遺伝子等の有用物質を標的組織の細胞内に導入するための運搬体として優れた効果を期待できるものの、現状では遺伝子の導入効率の点において、或いは調製の簡便性やコストの面において十分満足できるものとはなっていない。

【0010】即ち、本発明においては、有用物質の導入効率が高く、簡便な操作で調製でき、かつ、低コストの薬剤、生理活性物質、遺伝子等の運搬体を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者等が鋭意検討した結果、リン脂質、カチオン性脂質、及びポリエチレングリコール結合脂質を含有する微粒子を運搬体とすることにより上記従来技術の問題点が解決できることを見出

して本発明を完成した。

【0012】即ち、本発明は、リン脂質、カチオン性脂質、及びポリエチレングリコール結合脂質を含有することを特徴とする製剤用微粒子に関するものである。

【0013】また、本発明は、上記の製剤用微粒子と遺伝子との複合体であることを特徴とする遺伝子導入剤に関するものである。

【0014】

【発明の実施の形態】以下、本発明の製剤用微粒子（以下、単に「微粒子」と記す。）について詳細に説明する。

【0015】（1）構成成分

本発明に用いられるリン脂質は、製薬学的に許容され、微粒子を構成する基剤となり得るものであれば特に限定されないが、生体に対する毒性が低く、入手容易かつ安価である点において、天然のリン脂質を用いることが好ましく、後述するカチオン性脂質の正電荷を相殺しない電荷のリン脂質であることが更に好ましい。

【0016】かかるリン脂質としては、例えばホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジイルノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、カルジオリピン、スフィンゴミエリン、卵黄レシチン、大豆レシチン、リゾレシチン等の天然リン脂質、或いはこれらを定法により水素添加したもの（例えば水素添加大豆レシチン等）等が挙げられる。中でも、注射剤として使用実績がある点において大豆レシチンを用いることが好ましい。なお、本明細書において単に「リン脂質」というときは、後述するカチオン性脂質、ポリエチレングリコール結合脂質を含まないものとする。

【0017】上記リン脂質の疎水性部分を構成するアシル基の種類については特に限定されず、例えばラウロイル基、ミリストイル基、パルミトイル基、ステアロイル基、オレオイル基等のアシル基が挙げられる。

【0018】本発明に用いられるカチオン性脂質は、四級アンモニウム等の正電荷を有する原子団を分子内に有する脂質である限りにおいて、脂質部分の構造、正電荷を有する原子団の種類等は特に限定されない。カチオン性脂質を構成成分として含むことにより微粒子の外表面に正電荷が付与され、負電荷を帯びている遺伝子（DNA等の核酸）との結合率が向上する。

【0019】かかるカチオン性脂質としては、例えば3β[N-(N7, N'-ジメチルアミノ-エタン)-カルバモイル]コレステロール（以下「DC-コレステロール」と記す。）、ステアリルアミン、N-(α-トリメチルアンモニオアセチル)ドデシル-D-グルタメートクロリド、N-[1-(2, 3-オレオイルオキシ)プロピル]-N, N, N-トリメチルアンモニウムクロリド、2, 3-ジオレオイルオキシ-N-[2-(スペルミンカルボキシアミド)エチル]-N, N-ジメチル

-1-プロパンアンモニウムトリフルオロアセテート等が挙げられる。中でも、安価かつ入手容易である点においてDC-コレステロール及び／又はステアリルアミンが好ましい。

【0020】本発明に用いられるポリエチレングリコール結合脂質（以下「PEG脂質」と記す。）は、製薬学的に許容され、PEG鎖を結合せしめた脂質である限りにおいて特に制限はないが、脂質としては既述の天然リン脂質、PEG鎖としてはPEGの重量平均分子量が1000～12000程度のものが好ましい。

【0021】PEG脂質を構成成分として含むことにより微粒子と細胞との相互作用が強まり、微粒子と細胞との融合が促進される。また、PEG脂質を含有せしめるとPEG鎖が細胞の外側に配向し、微粒子が肝臓などの細網内皮系にトラップされることがないため、微粒子の安定性が向上し、製剤の体内における血中半減期が長くなるという効果をも奏する。

【0022】かかるPEG脂質としては、リボソーム製剤での使用実績がある点においてポリエチレングリコール2000-ジステアロイルフォスファチジルエタノールアミン（以下「PEG2000-DSPE」と記す。）が好ましい。

【0023】上記のリン脂質、カチオン性脂質、PEG脂質はいずれも、単独で或いは2種以上を混合して使用することが可能である。上記構成成分中における各脂質の比率としては、リン脂質を76.4～12質量%、カチオン性脂質を11.5～80質量%、PEG脂質を5～40質量%程度とすることが好ましい。

【0024】本発明の微粒子を遺伝子導入剤として使用する場合、上記構成成分の他、細胞との相互作用を高めるため、或いは細胞への遺伝子導入効果を向上させるため、更に塩化カルシウム及び／又はグリセリン等を含有していてもよい。上記構成成分全体に対し、塩化カルシウムは1質量%以下相当、グリセリンは0.01～2質量%相当を添加することによりその効果が発揮される。

【0025】以上説明したように、本発明の微粒子は、リン脂質が大豆レシチンであることが好ましく、カチオン性脂質が3β[N-(N7, N'-ジメチルアミノ-エタン)-カルバモイル]コレステロール及び／又はステアリルアミンであることが好ましく、ポリエチレングリコール結合脂質がポリエチレングリコール結合ジステアロイルホスファチジルエタノールアミンであることが好ましく、塩化カルシウム及び／又はグリセリンを含有することが好ましい。

【0026】（2）微粒子の調製方法

本発明の微粒子は、例えば以下の方法により調製することができる。

【0027】まず、リン脂質、カチオン性脂質、及びPEG脂質を適当な溶媒に溶解し、混合する。混合は、溶媒として水、各種有機溶媒（例えばメタノール、エタノール）を用いることが好ましい。



ール等の低級アルコール、クロロホルム等)、或いはこれらの混合物等を用い、常温で、若しくは40乃至80℃の加温下で行うことができる。

【0028】次いで、上記混合液の溶媒を留去して濃縮する。溶媒を留去する方法としては、ロータリーエバポレーター、真空乾燥機等を用い、常温で、若しくは40乃至80℃の加温下で行うことができ、N<sub>2</sub>ガス気流下で行うことが好ましい。

【0029】溶媒留去後において、水、所望により塩化カルシウム及び／又はグリセリンを含む水溶液を添加し、ホモジナイザー等の攪拌装置を用いて高速攪拌を行うことにより脂質を水中に分散させ、微粒子状とする。本発明の微粒子はその機能を確保するため粒子サイズを200μm以下とすることが好ましい。このような微粒子を得る方法としては、①攪拌速度を極力高速(例えば23000rpm)とする、②フィルターによる整粒処理を行う、等の方法が挙げられる。

【0030】攪拌は、溶液の温度上昇による脂質の酸化を抑制するため、氷冷下で行うことが好ましく、具体的には氷水で冷却した状態でホモジナイザーで攪拌する等の方法が挙げられる。なお、ポアサイズ0.45μm以下のメンブランフィルターを使用し、室温下、クリーンベンチ内で濾過することにより、上記整粒処理と滅菌を同時に行うことが可能である。

【0031】上記のように調製された微粒子はリポソームのような脂質二重膜構造をとらず、内水相も持たないナノパーティクルであるという特徴がある。即ち、正電荷が全て微粒子の外側に配向し、DNAとの複合体形成に有効に利用されるため、DNAとの複合体形成率が高く、標的組織の細胞内への遺伝子の導入効率を向上させることが可能である。また、水溶液中で安定であり、従前のカチオン性リポソームのような凍結融解等の前処理は不要であるため、短時間で簡便に調製可能であり、即時に使用することができる。

#### 【0032】(3) 製剤方法

本発明の微粒子は、上記のようにその調製自体が簡便である他、標的組織の細胞内に導入すべき有用物質と混合するのみで、容易に両者の複合体を形成し製剤化することが可能である。即ち、微粒子の調製及び製剤を単一工程の極めて簡便な操作で、かつ、約30分間程度の短時間に行うことができるため、遺伝子と複合せしめた遺伝子導入剤として特に好適に用いることができる。

#### 【0033】

【発明の効果】以上説明したように、本発明の微粒子は、リン脂質を主体として構成されたナノパーティクルであるため、DNAとの複合体形成率が高く、標的組織の細胞内への遺伝子の導入効率を向上させることが可能である。また、水溶液中で安定であり、従前のカチオン性リポソームのような凍結融解等の前処理は不要であるため、短時間で簡便に調製可能であり、即時に使用する

ことができる。更に、入手容易かつ安価な脂質を利用して調製できるので、コスト面でも問題がない。従って、本発明の微粒子は、遺伝子の導入効率において、或いは調製の簡便性やコストの面において十分とはいえなかった、従来のカチオン性リポソームに代わる遺伝子運搬体として特に有用である。

#### 【0034】

【実施例】以下、本発明の微粒子を遺伝子と複合せしめた遺伝子導入剤の例により、本発明を更に詳細に説明する。但し、本発明は下記の実施例に限定されるものではない。

【0035】(実施例1-1) 実施例1-1においては、リン脂質として大豆レシチン(フダ製薬社製:上海、中国)を、カチオン性脂質としてDC-コレステロール(シグマ社製)及びステアシルアミン(シグマ社製)を、PEG脂質としてPEG2000-DSPE(日本油脂社製)を使用し、表1に記載の組成比を有する微粒子を調製した。

#### 【0036】

【表1】

	濃度 (g/100ml)
大豆レシチン	1
ステアシルアミン	0.05
DC-コレステロール	0.1
PEG2000-DSPE	0.15
塩化カルシウム	0.01
グリセリン	0.15

【0037】まず、約45℃の加温下で、大豆レシチン100mg、DC-コレステロール10mg、ステアシルアミン5mg、PEG2000-DSPE15mgを14mlのエタノール(和光社製)に溶解し、回転式ロータリーエバポレーター(東京理化学器械社製)及び真空乾燥機(型番:VO-Z-4/清水理化学機器製作所製)により溶液量が約0.1mlとなるまでエタノールを留去し、濃縮した。

【0038】次いで、上記脂質薄膜に、0.01g/100mlの塩化カルシウム、及び0.15g/100mlのグリセリンを含む水溶液を約10ml加えて全量10mlとし、ホモジナイザーを用いて23000rpmで6分間攪拌し、脂質を微粒子状とした。

【0039】更に、ポアサイズ100nmの膜状フィルター(商品名:ニュクリポアーメンブラン、野村サイエンス社製)を使用し、室温下、クリーンベンチ内で濾過することにより、整粒・滅菌処理を行い、微粒子液を調製した。当該微粒子液は10mlのアンフルに封入した。実施例1-1の微粒子液を調製するのに要した時間は約30分程度であった。

【0040】(比較例1-1) 比較例1-1においては、試験前日に、カチオニックリポソーム試薬Tfx-20(プロメガ社製)を水に懸濁し、65℃で1分間加

熱し、更に $-20^{\circ}\text{C}$ で一夜凍結した後、解凍することによりリポソームを調製した。比較例1-1のリポソーム液を調製するのに要した時間は約12時間程度であった。

【0041】上記実施例1-1の微粒子、比較例1-1のリポソームについては、遺伝子を複合せしめて遺伝子導入剤とし、標的細胞への遺伝子導入効率によりその性能を評価した。

【0042】具体的には、標的細胞と上記遺伝子導入剤とを接触させて24時間培養した後、当該培養液をルシフェラーゼ酵素キットにより発光させ、蛍光強度を測定する方法により遺伝子導入効率を評価した（ルシフェラーゼアッセイ法）。なお、ルシフェラーゼ活性値は、タンパク質1 $\mu\text{g}$ あたりのルシフェラーゼ活性値に換算することにより評価した。

【0043】上記ルシフェラーゼアッセイ法においては、ルシフェラーゼ酵素キットはプロメガ社製のものを、蛍光強度の測定装置としてはケモルミノメーター（商品名：MicroLumat LB96P、EG&G Berthold社製）を使用した。また、タンパク質の定量は、CBB試薬（商品名：CBB色素試液（5倍濃縮）／ナカライテスク社製）を用いて行った。

【0044】微粒子、或いはリポソームと複合せしめる遺伝子としては、研究機関名ニューヨーク市立大学、Mt.Sinai医科大学のDr.Charless Mobbsから供与を受けたプラスミドDNA（AAV-CMV-Luc）を使用した（Sugiyama A., Hattori S., Tanaka S., Isoda F., Kleopoulos S., Kaplitt M., Sekihara H., Mobbs C.: Defective adenoassociated viral-mediated transfection of insulin gene by direct injection into liver parenchyma decreases blood glucose of diabetic mice. Horm. Metab. Res., 29(1997)599-603）。

【0045】一方、遺伝子を導入する標的細胞としては293細胞を使用した。培養液としてはダルベッコMEM（販売：NIPRO社、製造：コージンバイオ社）／RPMI 1640培養液（ライフテックオリエンタル社製）を使用した（以下、単に「培養液」と記す。）。

【0046】（実施例1-2）実施例1-2において

は、実施例1-1の微粒子液 $8\mu\text{l}$ 、上記プラスミドDNA $1\mu\text{l}$ （ $2\mu\text{g}$ ）、上記培養液 $31\mu\text{l}$ を軽く混合し、10分間室温に放置することにより遺伝子導入剤を調製した。

【0047】一方、培養した293細胞を、細胞培養用プレート（12穴、住友ベークライト社製）の各ウェルに $3\times 10^5$ 個／ウェルずつ分割し、細胞から培養液を吸引除去した後、リン酸緩衝液（PBS）で1回、血清Freeの培養液で1回洗浄し、各ウェルに血清Freeの培養液を $1\text{ml}$ ずつ分注した。

【0048】次いで、上記各ウェルに、調製した遺伝子導入剤を $40\mu\text{l}$ ずつ添加し、 $37^{\circ}\text{C}$ の条件下、 $\text{CO}_2$ インキュベーター中で培養して遺伝子導入を行い、所定時間経過後、各ウェルに培養液を添加して遺伝子導入を終了させた。なお、コントロールは、プラスミドDNAを添加しない以外は、全く同一の操作を行ったものとした。

【0049】（比較例1-2）比較例1-2においては、比較例1-1のリポソーム液 $6\mu\text{l}$ 、上記プラスミドDNA $1\mu\text{l}$ （ $2\mu\text{g}$ ）、上記培養液 $400\mu\text{l}$ を軽く混合し、10分間室温に放置することにより遺伝子導入剤を調製した。一方、培養した293細胞を実施例1-2と同様の細胞培養用プレートの各ウェルに $3\times 10^5$ 個／ウェルずつ分割し、24時間培養した。

【0050】培養後、細胞から培養液を吸引除去し、上記各ウェルに調製した遺伝子導入剤を $407\mu\text{l}$ ずつ添加し、ボルテックス処理を行った後、 $37^{\circ}\text{C}$ の条件下、 $\text{CO}_2$ インキュベーター中で培養して遺伝子導入を行い、所定時間経過後、各ウェルに培養液を添加して遺伝子導入を終了させた。

【0051】（結果）表2に示すように、実施例1-1の微粒子を使用した場合には、比較例1-1のリポソームを使用した場合と比較して、タンパク質あたりのルシフェラーゼ活性が明らかに高く、細胞内に効率良くプラスミドDNAが導入されていることが認められた。

【0052】

【表2】

	放置時間 (時間)	ルンフェーゼ活性値	タンパク質濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	タンパク質あたりの ルンフェーゼ活性値
実施例1	1	31511000	1950	16152
		32599884	2277	14314
		32650404	2523	12937
		22540	633	35
	2	32483100	1503	21603
		24495292	349	70146
		30432856	576	52834
		15452	547	28
	4	32493368	1420	22882
		31361740	850	36896
		32673876	709	46045
		15362	721	21
	6	29002816	1931	15013
		29435668	1962	15000
		32192044	720	44673
		25720	638	40
比較例1	1	4793354	747	6415

フロントページの続き

(51)Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	(参考)
A 6 1 K 47/24		A 6 1 K 47/24	
47/28		47/28	
48/00		48/00	
// C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA20 CA01 EA04 GA11  
 HA17  
 4C076 AA16 CC26 DD22 DD38 DD49  
 DD52 EE51 FF16 FF36 FF43  
 GG45  
 4C084 AA13 AA16 BA44 MA01 NA03  
 NA13 ZC012  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05  
 MA41 NA13 ZC01